云 南 植 物 研 究 1992; 14 (2): 193—197
Acta Botanica Yunnanica

寡糖素和椰乳对滇紫草愈伤组织培养的影响*

周立刚 郑光植 王世林 甘烦远

(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

摘要 C–7 和 C–8、G–7 和 G–8 是分别从黑节草和人参分离纯化的寡糖素。C–8 提高愈伤组织中紫草色素含量最为明显，达 5.795±0.024 mg／g DW，为对照的 3.27 倍。C–7、C–8、G–7 和 G–8 在滇紫草愈伤组织培养中促进色素合成的最适浓度分别为 5.0 ppm、1.0 ppm、2.5 ppm 和 2.5 ppm。椰乳加入到培养基中，能明显地促进色素的合成。椰乳浓度为 5.0% 时，色素含量达最高值为 8.935±0.242 mg／g DW，明显高于对照（1.727±0.103 mg／g DW）。椰乳和 4 种寡糖素对愈伤组织生长的影响均不大。

关键词 寡糖素；椰乳；滇紫草；紫草色素；愈伤组织

EFFECTS OF THE OLIGOSACCHARINS AND COCONUT MILK ON CALLUS CULTURE OF ONOSMA PANICULATUM

ZHOU LI–Gang, ZHEN Guang–Zhi, WANG Shi–Lin, GAN Fan–Yuan

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica,* Kunming 650204)

Abstract C–7 and C–8 are oligosaccharins extracted from *Dendrobium candidum,* G–7 and G–8 are oligosaccharins from *Panax ginseng*. The purple herb pigment content was increased by C–8 in *O.paniculatum* callus the most significantly among the four kinds of oligosaccharins, and its pigment content was 5.795±0.024 mg／g DW being 3.27 fold of the content in control callus. The optimum concentration of C–7, C–8, G–7 and G–8 for pigments synthesis of the callus were 5.0 ppm, 1.0 ppm, 2.5 ppm and 2.5 ppm respectively. Coconut milk (CM) used as a complicated supplement additive greatly stimulated the synthesis of the pigments. When the CM concentration was 5.0%, the content of the red pigments in the callus reached the greatest value (8.935± 0.242 mg／g DW) which was much higher than that in the control (1.727± 0.103 mg／g DW). CM and four kinds of oligosaccharins had few effects on the callus growth.

Key words Oligosaccharins; Coconut milk; *Onosma paniculatum*; Purple herb pigments; Callus

1991年3月收稿，1991年5月定稿。

*国家自然科学基金资助项目。

滇紫草 (*Onosma paniculatum* Bur. et Fr.) 属紫草科植物，主产云南。紫草色素为其主要药用成分。现代医学研究表明：紫草色素（以下简称色素）能抗菌消炎，对肝炎、高血糖、以及抗肿瘤均具有良好的治疗效果[1]。近年来由于不断采挖，加之人工栽培困难，致使这一资源的利用受到严重的限制。组织培养的目的在于使滇紫草细胞合成大量的有效成分色素。这不仅是保护滇紫草资源的有效措施，而且也是开发滇紫草及其色素新用途的又一途径[2]。国外对紫草 (*Litospermum erythrorhizon*) 细胞培养生产紫草色素的研究已取得重要进展[3—5]。国内朱蔚华等曾进行了滇紫草愈伤组织培养的研究[6]。如何提高愈伤组织中色素的含量以及进行代谢调节的研究还未见报道。作者也对滇紫草进行了组织培养[7—9]，研究发现在培养基中加入混合寡糖素能明显地促进色素的合成[10]。本文首次报道用单体寡糖素和椰乳对滇紫草愈伤组织培养产生色素的研究结果，为进一步建立滇紫草细胞两步培养系统，选择合适的生长培养基和生产培养基提供可靠的依据。

材料和方法

实验材料 实验材料是云南产的滇紫草。用于本研究的愈伤组织是1988年诱导，并经10—13次继代培养的茎愈伤组织无性系。继代培养30天转代一次。以LS培养基[11]为基本培养基，培养方法同前文[7—10]。

愈伤组织干重和色素含量的测定 50 ml容积的三角瓶内装培养基20 ml。愈伤组织培养40天后收获，冰冻干燥至恒重。以干重（DW）代表愈伤组织的生长，以每瓶愈伤组织干重的毫克数表示。将冰冻干燥的愈伤组织打成细粉。色素含量测定依Mizukami等[3]。将色素含量乘以愈伤组织干重即得色素产量。本文所得结果均为4次重复的平均值。

寡糖素和椰乳的加入 寡糖素和椰乳在配培养基时一同加入。本文所用寡糖素均为单体寡糖素，分别由黑节草和人参混合寡糖素分离纯化而得，属一类葡萄甘露聚糖，其制备方法和化学研究将另文发表。C-7和C-8为黑节草寡糖素，分别由7个单糖和8个单糖组成。G-7和G-8为人参寡糖素，亦分别由7个和8个单糖组成。这4种寡糖素均为经筛选后具活性的寡糖素。

结　　果

1. 寡糖素对滇紫草愈伤组织培养的影响

单体寡糖素C-7、C-8、G-7和G-8对滇紫草愈伤组织生长影响，结果如图1所示。4种寡糖素在所试浓度范围内，对愈伤组织生长均无显著影响 ($P>0.05$)。在低浓度下 (1.0—2.5 ppm)，各寡糖素对生长影响的差别较为明显，G-8浓度为1.5 ppm时轻微地促进愈伤组织生长，愈伤组织干重为 237.8 ± 10.3 mg / flask，G-7浓度为1.0 ppm时轻微地抑制愈伤组织生长，愈伤组织干重为 187.5 ± 10.1 mg / flask，而不加寡糖素的对照为 229.3 ± 13.1 mg / flask。这4种寡糖素浓度大于2.5 ppm时，对滇紫草愈伤组织的生长几乎无影响。从图1还不难看出，寡糖素C-7和G-7对生长的影响是类似的，C-8和G-8对生长的影响稍有不同。

寡糖素对滇紫草愈伤组织中色素含量的影响如图2所示。4种寡糖类对色素合成的影响均十分明显。C-7和G-7对愈伤组织中色素合成的影响是类似的，在较

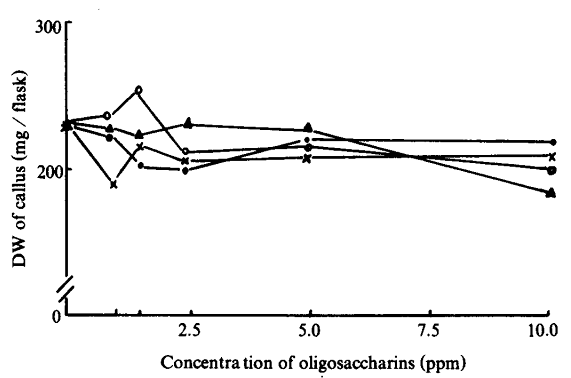


图 1. 寡糖素 C-7、C-8、G-7 和 G-8 对滇紫草愈伤组织生长的影响

Fig.1　Effects of oligosaccharin C-7、C-8、G-7 and G-8 on callus growth of *O.paniculatum*. Inoculum quantity was 108.4 mg / flask.

C-7: —·—·—　G-7: —×—×—

C-8: —▲—▲—　G-8: —·—·—

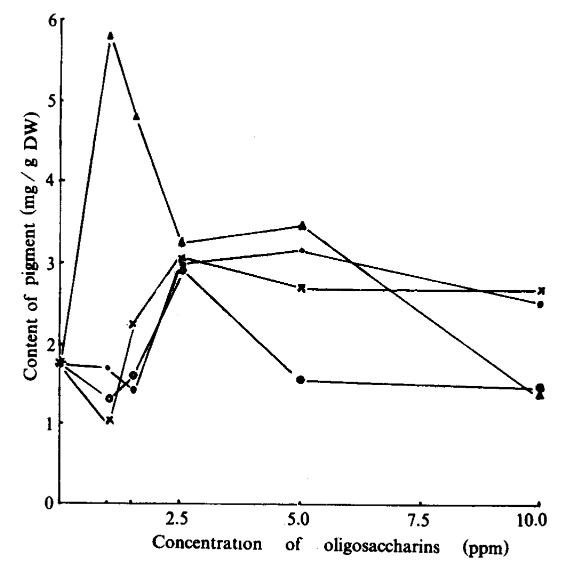


图 2. 寡糖素 C-7、C-8、G-7 和 G-8 对滇紫草愈伤组织色素含量的影响

Fig.2　Effects of oligosaccharin C-7, C-8, G-7 and G-8 on pigment content of *O.paniculatum* callus. Inoculum quantity was 108.4 mg / flask.

C-7: —·—·—　G-7: —×—×—

C-8: —▲—▲—　G-8: —·—·—

低浓度时（1.0—2.5 ppm），轻微抑制色素合成，浓度为 2.5—10.0 ppm 时，均能明显地促进色素的合成。C-7 浓度为 2.5 ppm 时，色素含量达最高值为 3.113±0. 012 mg／g DW，比对照提高了 75.67%，此时色素产量（综合了愈伤组织干重和色素含量两个指标）也最高，为 0.675 mg／flask，明显高于对照（0.406 mg／flask）。G-7 浓度为 2.5 ppm 时，色素含量达最高值为 2.982±0.051mg／g DW 。C-8 对色素合成的影响与 G-7、C-7 和 G-8 明显不同，较低浓度时（1.0—5.0 ppm）能明显地促进愈伤组织中色素的合成，加入浓度为 1.0 ppm 的 C-8，愈伤组织色素含量为 5.795±0.024 mg／g DW，为对照的 3.27 倍。较高浓度下，C-8 和 G-8 对色素合成影响较为一致，影响均不明显。综合图 1 和图 2，C-7、C-8、G-7 和 G-8 在滇紫草愈伤组织培养中促进色素合成的最适浓度分别为 5.0 ppm、1.0 ppm、2.5 ppm 和 2.5 ppm。

2. 椰乳（CM）对滇紫草愈伤组织培养的影响

结果如表 1 所示。在所试浓度（2.5—20.0%）中，CM 对愈伤组织生长均无明显影响，但显著地增加愈伤组织中色素的含量。CM 浓度为 5.0%时，色素含量达最高值，是对照的 5.17 倍。

讨　　论

植物细胞培养生产有用次级代谢物，常因为次级代谢物含量低而不能进入工业化生产。通常采用不同的措施如改变培养条件（两步法培养等）、筛选高产细胞系以及加入各种诱导因子来激活次级代谢过程中各种酶的活性等，能有效地提高次级代谢物的含量。寡糖素是一类与植物激素作用相同由细胞壁结构多糖衍生的一类新的调节分子[12]，近年来有人把它作为诱导因子用于植物细胞培养以促进次级代谢物的生

产[13—14]。

表 1. 椰乳（CM）对滇紫草愈伤组织培养的影响

Table 1. Effects of coconut milk (CM) on callus culture of *O.paniculatum* * ($n=4, \overline{X} \pm SD$)

CM 浓度 Concentration of CM (%)	愈伤组织干重 DW of callus (mg / flask)	色素含量 Content of pigments (mg / g DW)
0.0	275.6 ± 51.5	1.727 ± 0.103
2.5	296.1 ± 18.2	6.224 ± 0.118 * *
5.0	275.4 ± 17.8	8.935 ± 0.242 * *
10.0	288.3 ± 9.0	7.386 ± 0.063 * *
20.0	303.4 ± 25.9	5.784 ± 0.089 * *

* Inoculum quantity was 129.0 mg / flask.

* * $P<0.01$, compared with control.

国外在紫草细胞培养中曾采取多种办法如改变氮源、碳源以及加入金属离子等来提高色素的含量[3—5]。朱蔚华等采用筛选高产细胞株的办法来提高滇紫草愈伤组织中紫草素的含量[6]。我们发现人参和黑节草的混合寡糖素能明显地促进滇紫草愈伤组织中色素的合成[10]。对寡糖素的结构和功能研究发现，寡糖素的结构不同，其功能亦不相同，只有一定结构的寡糖素，才会具有诱导因子的活性。因此有必要将混合寡糖素分离纯化成单体寡糖素，进行生理效应的实验。从我们筛选的 4 种寡糖素来看，它们在适宜的浓度下均具有刺激滇紫草愈伤组织形成色素的活性，对生长均无明显的影响。4 种寡糖素中，G–7 和 C–7 对色素合成的影响较为一致，这提示它们可能有相似的作用机理。C–8 提高色素的含量最为明显，其作用效果与其它三种单体寡糖素明显不同，且在所试浓度中对色素合成均无明显抑制作用。故这 4 种寡糖素中，在促进色素合成方面以 C–8 最为理想，且所用的最适浓度也较低为 1.0 ppm，它更有可能应用于将来的工业化生产。此外寡糖素 G–7、C–7 和 G–8 在低浓度时能抑制色素合成，高浓度时则有促进作用，这与通常激素的作用不大一致，这表明它们的作用机理可能是不同的，据报道[15]，寡糖素与细胞膜上特定的受体结合，导致细胞生理生化的变化。

椰乳是一种成分复杂的有机添加剂，将其加入到培养基中，能明显地促进色素的合成，在所试验的各浓度中，色素的含量为对照的 3—5 倍，其效果优于寡糖素，这可能是椰乳中含有某些促进色素合成的调节因子，另外加入椰乳后也改变了培养基中的 C / N 比，C / N 比的改变可能也是色素产生的主要调节因子[4]。

总之，寡糖素和椰乳诱导滇紫草愈伤组织中色素合成的效果是明显的，对提高色素含量不失为一个有效的方法。寡糖素和椰乳诱导色素合成的机理还有待进一步研究。相信寡糖素的应用将会对植物细胞次级代谢工程产生有益的影响。

参考文献

〔1〕江苏新医学院编. 中药大辞典（下册）. 上海：上海科学技术出版社，1986；2342—2346

〔2〕郑光植. 植物次级代谢物细胞工程与资源开发利用. 云南植物研究 1988；增刊Ⅰ：125—134

〔3〕Mizuakmi H, Konoshima M, Tabata M. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in

Lithospermum callus cultures. *Phytochemistry* 1977; **18** (8): 1183—1186

〔4〕 Fujita Y, Hera Y, Ogino T, et al. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*Ⅳ. effects of notrogen sources on the productions of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep* 1981; **1** (1): 59—61

〔5〕 Tabata M, Fujita Y. Production of shikonin by plant cultures. In: *Biotechnology in Plant Science*. New York: Academic Press, 1985: 207—239

〔6〕 朱蔚华，樊红霞，胡秋等. 滇紫草愈伤组织的诱导培养及优良无性系的筛选. 中药材 1990; **13** (1): 6—9

〔7〕 周立刚，郑光植，徐纯. 滇紫草愈伤组织培养的初步研究. 云南植物研究 1991; **13** (2): 237—240

〔8〕 周立刚，郑光植，王世林. 滇紫草愈伤组织培养与紫草素生产. 云南植物研究 1991; **13** (3): 315—320

〔9〕 周立刚，郑光植，王世林等. 多糖对滇紫草培养细胞的影响. 天然产物研究与开发 1991; **3** (2): 34—38

〔10〕 周立刚，郑光植，王世林. 寡糖素对滇紫草愈伤组织色素合成的影响. 天然产物研究与开发 1990; **2** (2): 22—25

〔11〕 Linsmaier E F, Skoog F. organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1965; **18** (1): 100—127

〔12〕 王克夷. 寡糖素——一类新的植物调节分子. 植物生理学通讯 1989; (4): 56—58

〔13〕 郑光植，王世林，阿静波. 三七、人参和西洋参细胞悬浮培养的比较研究. 云南植物研究 1989; **11** (1): 97—102

〔14〕 周立刚，郑光植，王世林. 西洋参细胞大量培养的研究. 生物工物学报 1990; **6** (4): 316—321

〔15〕 何才平. 植物细胞壁寡糖素的生理功能. 细胞生物学杂志 1990; **12** (2): 64—67